

(19) RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
 INSTITUT NATIONAL
 DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
 PARIS

(11) N° de publication : **2 754 272**
 (à n'utiliser que pour les commandes de reproduction)

(21) N° d'enregistrement national : **96 12259**

(51) Int Cl⁶ : C 12 N 15/88, A 61 K 48/00, 9/133

(12)

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

(22) Date de dépôt : 08.10.96.

(71) Demandeur(s) : RHONE POULENC RORER SA
 SOCIETE ANONYME — FR.

(30) Priorité :

(43) Date de la mise à disposition du public de la demande : 10.04.98 Bulletin 98/15.

(72) Inventeur(s) : VACUS JOEL et BOUKHNIKACHVILI TSIALA.

(56) Liste des documents cités dans le rapport de recherche préliminaire : Se reporter à la fin du présent fascicule.

(73) Titulaire(s) : .

(60) Références à d'autres documents nationaux apparentés :

(74) Mandataire :

(54) PROCEDE DE PREPARATION DE COMPOSITIONS POUR LE TRANSFERT D'ACIDES NUCLEIQUES.

(57) La présente invention concerne un procédé de préparation d'une composition pour le transfert d'acides nucléiques comprenant la mise en contact d'un acide nucléique avec un lipide cationique, selon lequel, préalablement à la mise en contact, le lipide cationique est soumis à une étape de chauffage. L'invention concerne également les compositions obtenues et leur utilisation.

FR 2 754 272 - A1



PROCEDE DE PREPARATION DE COMPOSITIONS POUR LE
TRANSFERT D'ACIDES NUCLEIQUES

La présente invention concerne un procédé pour la préparation de compositions pour le transfert d'acides nucléiques. Les compositions 5 obtenues sont utilisables pour le transfert d'acides nucléiques dans les cellules *in vitro*, *ex vivo* ou *in vivo*.

La pénétration cellulaire d'un acide nucléique nu (généralement de haute masse moléculaire et chargé négativement) est un phénomène rare et qui, en général, ne conduit à la transfection de la cellule qu'avec une 10 efficacité très limitée. Pour cette raison, différents types de vecteurs et de techniques ont été décrits dans l'art antérieur pour la réalisation de ce transfert. On peut distinguer à cet égard deux grandes familles : les vecteurs viraux et les techniques physiques.

Parmi les vecteurs viraux, on peut citer par exemple les rétrovirus, les 15 adénovirus, les AAV, les virus de l'herpès, les baculovirus, etc. L'efficacité de transfert obtenue avec des vecteurs viraux est généralement très bonne. Cependant, leur construction et leur production sont difficiles, la capacité de 20 clonage de ces vecteurs est parfois limitée, et leur utilisation peut dans certains cas présenter certains inconvénients inhérents à l'emploi de virus (dissémination, pathogénicité, etc).

Pour ces raisons, différentes techniques physiques de transfert d'acides nucléiques ont été développées. On peut citer par exemple l'électroporation, la coprécipitation ou l'emploi de canons à particules.

L'électroporation consiste à appliquer un champ électrique à une 25 suspension de cellules contenant de l'ADN. Cependant, si cette technique donne dans certains cas de bons résultats, elle est difficile à optimiser en raison du risque de lésions irréversibles de la membrane cellulaire. Dans la technique du canons à particules, des particules (or, tungstène) sont

recouvertes d'acide nucléique puis projetées sur les cellules. Cette méthode est cependant prometteuse essentiellement pour les cellules à paroi, telles que les cellules végétales. Par ailleurs, la coprécipitation de l'ADN avec certains polymères (DEAE) ou le phosphate de calcium présente

5 l'inconvénient d'être peu reproductible et parfois cytotoxique.

Pour remédier à ces inconvénients, des vecteurs de transfert synthétiques ont été mis au point. Le rôle de ces vecteurs est essentiellement de présenter l'acide nucléique sous une forme propice à la pénétration cellulaire, de faciliter cette pénétration (dans le cytoplasme puis 10 dans le noyau) ainsi que de préserver des nucléases cytoplasmiques.

Parmi ces vecteurs, les lipides cationiques possèdent des propriétés intéressantes. Ces vecteurs sont constitués d'une partie lipidique, hydrophobe, interagissant avec les acides nucléiques, et d'une partie polaire, cationique, favorisant la pénétration cellulaire. Des exemples particuliers de 15 lipides cationiques sont notamment la lipopolylsine, les lipides monocationiques (DOTMA : LipofectinR); certains détergents cationiques (DDAB); les lipospermes (DOGS, DPPES, etc), les lipothermomes, etc.

L'utilisation de ce type de vecteur, éventuellement en association avec un lipide fusogène (DOPE, etc), a montré qu'ils possèdent de bonnes 20 propriétés de transfert d'acides nucléiques *in vitro*, *ex vivo* et *in vivo* sur de nombreux types cellulaires. Ces vecteurs constituent donc une alternative avantageuse aux vecteurs viraux et aux techniques physiques de transfert d'acides nucléiques. Cependant, l'exploitation de ces vecteurs au niveau 25 industriel est pour l'instant limitée. En particulier, les méthodes de préparation de ces vecteurs décrites dans l'art antérieur sont empiriques, peu industrialisables, peu reproductibles, et conduisent à des mélanges mal définis et dont la composition ne donne pas de propriétés optimales.

Ainsi, il est connu de préparer des compositions par mélange des différents composants lipidiques dans le chloroforme, séchage sous flux d'azote

pendant 20 minutes puis séchage sous vide. Le film lipidique ainsi obtenu est repris par de l'eau désionisée [Hui 96], [Felgner 87]. Le mélange est ensuite vortexé pour resuspendre le lipide et soniqué dans un bain à sonication 10 minutes jusqu'à clarification de la suspension qui peut être ensuite diluée. La 5 compaction est réalisée immédiatement avant ajout sur les cellules et laissé 4 heures à 37°C dans un milieu de culture F10. Des variantes de cette technique peuvent être rencontrées. Par exemple après dissolution par le chloroforme et séchage, le film peut être repris par une solution de NaCl à 20 mM [Guershon 93] ou de tampon Hepes à 20 mM [Gao 91]. La suspension 10 est en général vortexée (immédiatement après reprise du film ou après une phase d'hydratation de 24 heures à 4°C [Gao 91]) et soniquée pendant des temps variables. Parfois la force ionique et la nature des ions du complexe peuvent être ajustés après compaction [Xu 1996]. L'opération de sonication en elle-même comporte des variantes puisque certains auteurs utilisent des 15 sondes de sonication en Titane [Gustafsson 1995].
Le mode de préparation consistant en la formation d'un film par dissolution par le chloroforme, évaporation, séchage, reprise par un milieu aqueux et sonication est également fréquemment rencontré pour la fabrication des liposomes composés d'un lipide neutre associé à un tensioactif cationique 20 [Pinnaduwage 89].

Un autre mode de préparation consiste à diluer directement les lipides du commerce (en solution éthanolique, suspension aqueuse ou formulation liposomique) dans du milieu de culture MEM. Après une dilution identique de l'ADN, les deux composants sont mélangés par inversion et la suspension 25 est laissée à température ambiante pendant 15 à 30 minutes. Ensuite une nouvelle dilution est effectuée avant mise en contact avec les cellules pendant 6 heures [Fasbender 95]. Le lipide du commerce et l'ADN peuvent également être simplement dilués séparément dans l'eau distillée avant mise en contact par simple agitation et une éventuelle incubation à température 30 ambiante pendant 15 minutes [Bringham 89].

Selon d'autres méthodes, la forme initiale du lipide est une solution éthanolique de concentration variable qui est diluée extemporanément dans du milieu de culture juste avant contact avec l'ADN [Behr 89]. La solution éthanolique peut être diluée également dans d'autres milieux (eau, NaCl à diverses concentrations) immédiatement ou 10 minutes avant compaction. A l'issue de la compaction et d'une éventuelle attente de 10 minutes, une nouvelle dilution peut avoir lieu dans un milieu de composition ionique variable. La transfection est réalisée après un temps de 0 ou 10 minutes après la dernière dilution [Barthel 93]. La solution éthanolique peut aussi être introduite directement dans la suspension aqueuse contenant l'ADN et le mélange peut subir ultérieurement une sonication en bain [Demeneix 91].

Il est aussi connu de solubiliser des liposomes cationiques composés d'un mélange DOSPA/DOPE [Hofland 96] par une solution à 1% d'Octylglucoside (OG) dans une solution à 10 mM de Tris (pH 7,4). Après contact avec l'ADN 15 le complexe est dialysé trois fois (afin d'éliminer les micelles d'OG excédentaires) contre 2000 volumes de Tris 10 mM / 5% de dextrose (pH 7,4) pendant plus de 48 heures à une température de 4°C. La transfection est réalisée pendant 4 à 5 heures à 37°C dans le DMEM dénué de sérum.

La préparation des liposomes cationiques peut être également réalisée par 20 réhydratation du film lipidique suivie d'extrusions successives à travers des membranes en polycarbonate de porosité calibrée [Düzunges 89] ou d'une microfluidisation [Sternbergn 94].

Tous ces modes de préparation présentent des inconvénients pour une extrapolation à une échelle industrielle. La sonication peut difficilement être 25 utilisée à une telle échelle et la stabilité des vésicules ainsi formées s'avère souvent insuffisante. De plus, les sondes utilisées pour la sonication, d'origine métallique, peuvent libérer dans le milieu des particules générantes pour des applications pharmaceutiques. De même la filtration ne donne que des liposomes de taille définie par la porosité de la membrane au sortir de la 30 filtration et dont la stabilité dans le temps n'est pas assurée. L'utilisation de

lipides sous la forme d'une solution éthanolique, outre le problème d'utilisation d'un solvant organique, s'avère induire la formation de particules très polydispersées.

La demanderesse a maintenant mis au point un nouveau procédé de
5 préparation de compositions transfectantes.

Ce procédé découle plus particulièrement de la caractérisation par la demanderesse des propriétés physicochimique des vecteurs lipidiques. La demanderesse a ainsi montré que, selon les conditions, ces vecteurs existent dans différents états physicochimiques (forme micellaire, forme
10 d'agrégats matures, etc). La demanderesse a permis plus particulièrement de caractériser les différents états physicochimiques des vecteurs lipidiques, elle a également mis en évidence des moyens permettant de contrôler le passage entre ces différents états, et de stopper la maturation dans des états définis, propices à la complexation avec l'ADN et à la transfection cellulaire.
15 La présente invention décrit ainsi un procédé reproductible permettant la préparation au niveau industriel de compositions transfectantes caractérisées et calibrées.

Le procédé de l'invention repose plus particulièrement sur la réalisation d'un traitement préalable du lipide cationique, permettant l'obtention d'une
20 suspension homogène micellaire. Ainsi, un premier objet de l'invention concerne un procédé de préparation d'une composition pour le transfert d'acides nucléiques comprenant la mise en contact d'un acide nucléique avec un lipide cationique, caractérisé en ce que, préalablement à la mise en contact, le lipide cationique est soumis à une étape de chauffage.

25 La demanderesse a étudié les caractéristiques physicochimiques des différents lipides cationiques. Les résultats obtenus montrent que, selon la force ionique du milieu, selon le pH du milieu ou encore selon la température, les lipides cationiques existent sous différents états physiques. Les exemples présentés ci-après décrivent notamment des diagrammes de

phase de différents lipides cationiques (lipospermines, lipothermines) ainsi qu'une étude de la densité optique en fonction du pH et de la température, qui font apparaître clairement des états physicochimiques différents selon les conditions. La demanderesse a maintenant montré que ces différents états 5 avaient des propriétés de compaction avec l'ADN et de transfection cellulaire différents, et qu'il était avantageux de disposer d'une méthode permettant de contrôler de manière reproductible l'accès à ces différents états.

Le procédé selon l'invention, impliquant notamment le chauffage de la suspension lipidique, présente l'avantage d'une méthode simple et 10 facilement transposable aux contraintes de l'exploitation industrielle. Il permet en outre, par le contrôle de la cinétique d'organisation, la maîtrise de la structure adoptée par le lipide avant et après sa mise en contact avec l'ADN. Le procédé de l'invention permet en outre une standardisation de la méthodologie de préparation, indispensable à l'échelle industrielle.

15 Plus particulièrement, l'étape préalable consiste à chauffer le lipide cationique jusqu'à formation d'une solution micellaire. Encore plus préférentiellement, le vecteur lipidique est chauffé jusqu'à une température supérieure à sa température de transition de phase. La température de transition de phase correspond à la température à laquelle les chaînes 20 lipidiques fondent. Cette température peut être déterminée, pour chaque vecteur lipidique, par les techniques connues de l'homme du métier. En particulier, il est possible d'utiliser la méthode d'Analyse Thermique Différentielle (ou DSC : "Differential Scanning Calorimetry") au moyen par exemple de l'appareil DSC4 (Perkin Elmer) en suivant les recommandations 25 du fabricant, comme illustré dans les exemples.

Le procédé de l'invention est applicable à tout type de lipide cationique. Il est particulièrement adapté à la préparation de lipopolyamines. Les lipopolyamines sont des molécules amphiphiles comprenant au moins une région hydrophile polyamine et une région lipophile liées covalamment entre- 30 elles par un bras chimique. Avantageusement, la région polyamine répond à

la formule générale $H_2N\text{--}(\text{CH})_m\text{--NH}\text{--}I\text{--H}$ dans laquelle m est un nombre entier supérieur ou égal à 2 et I est un nombre entier supérieur ou égal à 1, m pouvant varier entre les différents groupes de carbone compris entre deux amines. Préférentiellement, m est compris entre 2 et 6 inclusivement et I est 5 compris entre 1 et 5 inclusivement. Encore plus préférentiellement, la région polyamine est représentée par la spermine ou par la thermine, ou par un analogue ayant conservé ses propriétés de liaison à l'ADN.

La région lipophile peut être une ou plusieurs chaînes hydrocarbonées, saturées ou non, du cholestérol, un lipide naturel ou un 10 lipide synthétique capables de former des phases lamellaires ou hexagonales. Avantageusement, la région lipophile comprend deux chaînes hydrocarbonées.

En outre, le lipide cationique peut être combiné à des adjuvants lipidiques, comme indiqué plus loin.
15 Des exemples préférés de lipides cationiques sont notamment les lipospermines, en particulier la dioctadécylamidoglycyl spermine (DOGS) ou la 5-carboxyspermylamine de la palmitoylphosphatidylethanolamine (DPPES), dont la préparation a été décrite par exemple dans la demande de brevet EP 394 111. Une autre famille préférée est constituée par les 20 lipothermines, parmi lesquelles on peut mentionner plus particulièrement le RPR120531 et le RPR120535 (FR9513490, WO96/17823 incorporées à la présente par référence). La structure de ces composés est représentée sur la figure 1.

Pour la mise en oeuvre du procédé de l'invention, le lipide, sous forme de 25 poudre cristalline ou de film, est repris par de l'eau pure ou un milieu salin dont le pH est éventuellement ajusté. L'homogénéisation est réalisée par chauffage au dessus de la température de transition du lipide, c'est à dire la température à partir de laquelle les chaînes aliphatiques fondent. Comme indiqué ci-dessus, cette température de transition de phase peut être 30 déterminée par analyse thermique différentielle. Dans le cas du DOGS par exemple, elle est de 38°C dans l'eau à pH 7,5, et elle est de 44°C à un pH de

8,8. Cette température de transition est bien entendu variable d'un lipide à un autre, (Cf les exemples). En particulier, pour le RPR12531, la température de transition de phase telle que déterminée par DSC et turbidimétrie est de 51,5°C (poudre) et 30°C (hydraté, pH 7,5). Pour le RPR120535, elle est de 5 43°C environ (hydraté, pH 7,5). Le chauffage peut être obtenu au bain-marie, par chauffage direct, ou encore par tout moyen permettant d'élever la température. Il permet la formation d'une solution micellaire caractérisée par la clarification de la suspension. La présence de micelles a été mise en évidence par des techniques telles que la turbidimétrie, la diffusion/diffraction 10 des rayons X aux petits angles et par Cryo-microscopie électronique en transmission.

Un autre avantage inattendu du procédé de l'invention réside dans l'efficacité de transfection des compositions. Ainsi, de manière particulièrement avantageuse, les compositions obtenues permettent la transfaction de 15 cellules indépendamment de la présence de sérum. Il est en effet connu que le sérum (sérum de veau fétal par exemple) exerce un effet inhibiteur de la transfaction par les lipides cationiques (in vitro, ex vivo ou in vivo). Les résultats présentés dans les exemples montrent que le procédé de l'invention peut permettre, par chauffage préalable du lipide, de lever cette inhibition par 20 le sérum. Ainsi, les compositions selon l'invention possèdent une efficacité de transfaction aussi bonne en présence et en l'absence de sérum.

L'acide nucléique peut être mis en contact avec la solution lipidique directement après obtention de la solution micellaire, et le complexe nucléolipidique obtenu utilisé directement pour la transfaction cellulaire. 25 L'avantage de telles compositions réside notamment dans leur caractère homogène, défini et reproductible. Toutefois, la demanderesse a également montré que pour améliorer encore les propriétés des compositions, notamment les propriétés de transfaction, il est avantageux de procéder à une maturation du lipide cationique avant la mise en contact avec l'acide 30 nucléique (maturation pré-compaction) et/ou du complexe nucléolipidique après la mise en contact (maturation post-compaction). La maturation du

lipide/complexe permet de réorganiser le lipide cationique sur le plan de sa structure et sur le plan de sa taille. La demanderesse a en effet montré qu'un lipide en solution micellaire tel qu'obtenu au cours de la première étape du procédé de l'invention peut évoluer pour former des corps organisés de taille 5 et de structure différentes. La demanderesse a également montré que l'état d'organisation du lipide cationique avait une influence sur sa capacité à complexer (ou compacter) les acides nucléiques, ainsi que sur ses propriétés de transfection.

Un procédé de l'invention comprend en outre, entre l'étape de 10 chauffage et la mise en contact, un étape de maturation pré-compaction du vecteur lipidique.

Un procédé de l'invention comprend en outre, après la mise en contact, une étape de maturation post-compaction du complexe nucléolipidique.

15 En partant de la solution micellaire, il est possible, en favorisant les interactions entre les différentes molécules lipidiques et la réorganisation intramoléculaire, de former différents corps organisés. Les exemples présentés ci-après montrent en particulier que les lipides cationiques passent par des états organisés inattendus de type lamellaire, tubulaire ou 20 vermiculaire. Lorsque la maturation est poursuivie, des états de taille plus importante apparaissent, tels que des états colonnaires ou hexagonaux. Ces différentes structures présentent des propriétés différentes.

Pour la mise en oeuvre de l'invention, il est avantageusement procédé à une 25 étape de maturation pré-compaction. Cette étape est avantageusement réalisée jusqu'à apparition d'agrégats organisés de type lamellaire, tubulaire, vermiculaire, colonnaires et/ou hexagonaux. Plus préférentiellement, cette étape est réalisée jusqu'à apparition d'agrégats organisés de type lamellaire, tubulaire et/ou vermiculaire. Ce type de corps présente en effet une structure originale, tout particulièrement propice à la complexation avec les acides 30 nucléiques.

La maturation peut être réalisée par tout moyen permettant d'augmenter les interactions entre les molécules de lipide cationique, ou de favoriser la réorganisation intramoléculaire. Selon l'invention, la maturation est avantageusement réalisée par diminution de la température, augmentation

5 du pH du milieu et/ou augmentation de la force ionique du milieu.

En diminuant la température, les chaînes aliphatiques grasses se réorganisent et permettent de restructurer le lipide cationique. Les résultats présentés sur la Figure 2 montrent l'évolution claire de la densité optique d'une solution de lipide, reflétant l'architecture interne dudit lipide, en

10 fonction de la température du milieu. En augmentant le pH ou la force ionique du milieu, il est possible de modifier l'état des charges ioniques positives présentes sur la partie cationique du vecteur. Ainsi, en neutralisant (pH) ou en protégeant (écrantage, force ionique) progressivement les charges, la demanderesse a montré que l'on réduisait progressivement, de

15 manière contrôlable, les forces de répulsion électrostatique entre les molécules de lipide, et favorisait les interactions et la réorganisation en agrégats structurés. Les résultats présentés sur les figures 4 et 5 montrent l'effet du pH et de la force ionique sur l'état d'organisation du lipide. Les photos présentées figure 3 illustrent les différents corps mis en évidence.

20 Avantageusement, la maturation pré-compaction est réalisée par diminution de la température. Encore plus préférentiellement, elle est réalisée par incubation de la solution à température ambiante. Ceci permet une cinétique de maturation (d'agrégation et de réorganisation) progressive et lente, propice à la compaction avec les acides nucléiques. La maturation peut être
25 poursuivie pour une durée variable selon le lipide et selon les conditions de pH et de force ionique. Les exemples ci-après montrent que cette maturation peut être effectuée sur une période allant de quelques heures à 1 mois. La durée de la maturation pré-compaction est déterminée notamment par l'apparition de corps structurés de type lamellaire, tubulaire ou vermiculaire.

La maturation peut également être réalisée par augmentation de la force ionique du milieu. A cet égard, il est avantageux de se placer, soit lors de la solubilisation, soit lors de la maturation, soit lors de la mise en contact (compaction), dans une solution de force ionique comprise entre 0 et 0,5M.

5 De préférence, on utilise une solution proche de l'isotonie (0,15M), c'est-à-dire une force ionique comprise entre 0,05 et 0,2 M. Différents sels peuvent être utilisés (NaCl; KNO₃, KI, etc).

Par ailleurs, il est également possible de jouer sur le pH lors de la phase de maturation. En particulier, quel que soit le pH de la solution micellaire (pH acide ou déjà ajusté), il est avantageux, lors de la maturation ou lors de la compaction, de travailler dans un zone de pH comprise entre 3 et 9, de préférence entre 6 et 9. Le pH est bien entendu ajusté par l'homme du métier en fonction des pK des vecteurs lipidiques utilisés. Un zone de pH avantageuse est celle à laquelle 30% au moins des amines du vecteur 15 cationique sont déprotonées, de préférence 40% au moins.

D'une manière générale, indépendamment du pH et de la force ionique, la maturation pré-compaction est réalisée par diminution de la température. Cette diminution peut être accompagnée de modifications de pH et de force ionique, soit lors de la maturation, soit lors de la compaction elle-même.

20 A titre illustratif, dans les conditions de pH et de force ionique intermédiaires (par exemple pour le DOGS dans NaCl 150 mM à un pH ≤ 8), les états d'organisation suivants sont observés :

Une suspension de DOGS dans le NaCl 150 mM à pH 7,5 est composée :

- essentiellement de micelles sphériques, immédiatement après 25 chauffage à 50°C environ (figure 3a),
- de micelles sphériques de petits bâtonnets et de vermicules de longueur variable, trois heures après chauffage et refroidissement à température ambiante (figure 3b),

- de plaquettes de structures lamellaire dont la taille est variable, une semaine après chauffage et refroidissement à température ambiante (figure 3c),
- uniquement de grandes plaques de structure lamellaire, un mois

5 après chauffage et refroidissement à température ambiante (figure 3d).

A un pH natif (3,5 environ), la même suspension est composée de micelles sphériques et de vermicules un jour après chauffage et refroidissement à température ambiante.

Dans un milieu DMEM ajusté à pH 5 une suspension de DOGS est
10 composée :

- uniquement de micelles sphériques, immédiatement après chauffage,
- de micelles sphériques et de vermicules, 5 heures ou une semaine

après chauffage et refroidissement à température ambiante.

Ces observations montrent comment le temps de maturation peut être adapté
15 en fonction du lipide et des conditions de milieu pour former des agrégats organisés de type lamellaire ou vermiculaire. Dans la mesure où il est maintenant possible de connaître la structure adoptée par le lipide en fonction des conditions de milieu et de temps après chauffage, il est permis de contrôler la structure lipidique qui est mise ultérieurement en contact avec
20 l'ADN. Par ailleurs, la réversibilité du procédé de chauffage/refroidissement/"maturation pré-compaction" est totale. Quel que soit le temps de maturation ayant été effectué, il est donc possible de rechauffer la suspension pour revenir à un état micellaire commun à toutes les conditions.

25 Après l'étape de chauffage et la maturation pré-compaction éventuelle, le lipide est mis en contact avec l'acide nucléique.

L'acide nucléique peut être un ADN ou un ARN. Il peut s'agir d'un ADN linéaire ou circulaire, superenroulé ou relâché, de type plasmidique ou pas, portant différents éléments génétiques (phase codante, promoteurs,

terminateurs, sites de liaisons, origines de réPLICATION, etc). L'acide nucléique peut être d'origine variées (humaine, animale, eucaryote inférieure, procéryote, plante, virale, phagique, etc). Il peut également s'agir d'un acide nucléique synthétique ou semi-synthétique. La taille de l'acide nucléique

5 peut être très variable (de l'oligonucléotide au génome complet). L'avantage des compositions de l'invention réside en outre dans leur application au transfert d'acides nucléiques de toute taille. Selon un mode de mise en oeuvre particulier, l'acide nucléique est un ADN (par exemple un plasmide ou un fragment d'ADN) portant une cassette d'expression d'une protéine ou d'un

10 ARN particulier. Il peut s'agir d'une protéine thérapeutique ou agro-alimentaire (enzyme, acide aminé, etc), en vue de produire ladite protéine ou ledit ARN in vitro, ex vivo ou in vivo. En outre, l'acide nucléique utilisé peut être un mélange d'acides nucléiques différents, ayant des propriétés différentes.

15 L'acide nucléique peut être préparé par toutes les techniques connues de l'homme du métier (criblage de banque, synthèse artificielle, méthodes mixtes, etc).

Pour la mise en contact (compaction), l'acide nucléique (la composition d'acides nucléiques) est solubilisé dans un milieu aqueux. La composition, la force ionique et le pH de ce milieu peuvent être ajustés pour améliorer l'efficacité de la compaction et les propriétés de transfert des compositions finales. En particulier, il a été constaté dans les études réalisées avec le DOGS qu'une compaction réalisée dans un milieu où le lipide pouvait se trouver à l'état micellaire pendant son contact avec l'ADN (c'est à dire dans un milieu de très faible force ionique et /ou de faible pH), et ce, quel que soit son état précédent l'étape de mise en contact, ne permettait pas une bonne efficacité de transfection en présence de sérum de veau foetal. Ainsi, de manière avantageuse, la compaction est effectuée dans un milieu salin, dans une zone de pH comprise entre 4 et 10. Avantageusement, la compaction est réalisée dans un milieu de pH compris entre 6 et 9. Concernant la salinité du milieu, elle est avantageusement comprise entre 0 et 2M, de préférence

entre 0,01 et 0,5M, encore plus préférentiellement entre 0,05 et 0,2M. Un milieu avantageux pour la compaction est un milieu proche de l'isotonie (0,15M), dont le pH est compris entre 6 et 9. Ces conditions peuvent être celles du milieu de chauffage du lipide ou celles de la maturation pré-compaction. Dans ces conditions, la compaction peut avoir lieu sans modification du milieu. Si les conditions de la maturation pré-compaction sont différentes, il est avantageux d'ajuster la composition du milieu comme indiqué ci-dessus. Les résultats présentés dans les exemples montrent en effet que, dans ces conditions, il est possible d'obtenir des compositions ayant des propriétés de transfection particulièrement inattendues et avantageuses. En particulier, il est possible d'obtenir des compositions insensibles à l'effet inhibiteur par le sérum, ce qui est particulièrement avantageux pour des utilisations vitro (SVF) ou vivo.

Pour la mise en contact, les quantités et concentrations respectives d'acide nucléique et de lipide peuvent varier. Ces quantités et concentrations sont celles décrites dans l'art antérieur pour l'utilisation de ces vecteurs. En particulier, les quantités respectives d'acide nucléique et de lipide utilisées sont déterminées par le rapport de charges positives du lipide et négatives de l'acide nucléique. Ce rapport de charge peut varier dans une fourchette de 0,01 à 100, et être adapté par l'homme de l'art, en fonction du lipide sélectionné et de l'acide nucléique sélectionné. Avantageusement, il est compris entre 0,01 et 20.

Le complexe nucléolipidique ainsi obtenu peut être utilisé tel quel pour la transfection. Il peut également être soumis une maturation dite de "post-compaction", permettant d'optimiser l'organisation structurale du complexe en vue d'améliorer ses propriétés de transfert. En effet, les états d'organisation des lipides permettant une bonne compaction avec l'acide nucléique ne sont pas nécessairement ceux donnant les meilleurs niveaux de transfection. Ainsi, il est avantageux de réaliser une maturation post-compaction jusqu'à l'apparition d'agrégats organisés de type lamellaires, colonnaires et/ou hexagonaux. Lorsque de tels agrégats existent déjà lors de

la compaction, il peut être avantageux de réaliser une maturation post-compaction pour homogénéiser la composition. Les conditions et les moyens de la maturation post-compaction sont similaires à celles de la maturation pré-compaction. La durée de cette maturation est adaptée par l'homme du métier en fonction de la maturation pré-compaction, et du vecteur lipidique.

Les compositions obtenues peuvent être utilisées extemporanément pour le transfert d'acides nucléique. Elles peuvent également être stockées et conservées, par exemple sous forme lyophilisée ou congelée, en vue d'une utilisation ultérieure. Comme indiqué ci-dessus, les compositions de l'invention présentent de nombreux avantages pour une utilisation industrielle. Elles sont calibrées, homogènes, reproductibles, stables et offrent des pouvoirs de transfert élevés.

Un objet de l'invention réside en particulier dans une composition pour le transfert d'acides nucléiques comprenant un acide nucléique complexé à un lipide cationique, caractérisée en ce que l'efficacité de transfert n'est pratiquement pas altérée par la présence de sérum et en ce qu'elle peut être obtenue par le procédé décrit ci-dessus.

La composition comprend préférentiellement, comme lipide cationique, une lipopolyamine. Encore plus préférentiellement, il s'agit d'une lipothermine ou d'une lipospermine, ayant de préférence 2 chaînes grasses. Par ailleurs, certains adjuvants peuvent être ajoutés aux compositions, et notamment des adjuvants lipidiques. Plus préférentiellement, les adjuvants lipidiques sont des lipides neutres ayant 2 chaînes grasses.

De manière particulièrement avantageuse, on utilise des lipides naturels ou synthétiques, zwitterioniques ou dépourvus de charge ionique dans les conditions physiologiques. Il peuvent être choisis plus particulièrement parmi la dioleoylphosphatidyléthanolamine (DOPE), le oléoyl-palmitoylphosphatidyléthanolamine (POPE), le di-stéaroyl-, -palmitoyl, -mirystoyl phosphatidyléthanolamine ainsi que leurs dérivés N-méthylés 1 à 3 fois; les phosphatidylglycérols, les diacylglycérols, les glycosyldiacylglycérols, les cérébrosides (tels que notamment les

galactocérébrosides), les sphingolipides (tels que notamment les sphingomyélines) ou encore les asialogangliosides (tels que notamment les asialoGM1 et GM2).

Ces différents lipides peuvent être obtenus soit par synthèse, soit par extraction à partir d'organes (exemple : le cerveau) ou d'oeufs, par des techniques classiques bien connues de l'homme du métier. En particulier, l'extraction des lipides naturels peut être réalisée au moyen de solvants organiques (voir également Lehninger, Biochemistry).

Préférentiellement, les compositions de l'invention comprennent, en plus du lipide cationique, de 0,1 à 20 équivalents molaires de lipide neutre pour 1 équivalent molaire de phosphate de l'acide nucléique, et, plus préférentiellement, de 1 à 5.

Dans un mode de réalisation particulièrement avantageux, les compositions de la présente invention comprennent un élément de ciblage permettant d'orienter le transfert de l'acide nucléique. Cet élément de ciblage peut être un élément de ciblage extracellulaire, permettant d'orienter le transfert de l'acide nucléique vers certains types cellulaires ou certains tissus souhaités (cellules tumorales, cellules hépatiques, cellules hématopoïétiques, etc). Il peut également s'agir d'un élément de ciblage intracellulaire, permettant d'orienter le transfert de l'acide nucléique vers certains compartiments cellulaires privilégiés (mitochondries, noyau, etc).

Plus préférentiellement, l'élément de ciblage est lié, de manière covalente ou non covalente, au lipide. La liaison peut notamment être obtenue par interaction ionique avec les ammonium, ou par attaque nucléophile des amines du vecteur sur des éléments de ciblage comportant un groupement nucléofuge (halogène, tosylate, etc), un ester activé (hydroxysuccinimide, etc) ou encore un isothiocyanate. L'élément de ciblage peut également être lié à l'acide nucléique.

Parmi les éléments de ciblage utilisables dans le cadre de l'invention, on peut citer les sucres, les peptides, les oligonucléotides ou les lipides. Préférentiellement, il s'agit de sucres et/ou peptides tels que des

anticorps ou fragments d'anticorps, des ligands de récepteurs cellulaires ou des fragments de ceux-ci, des récepteurs ou fragments de récepteurs, etc. En particulier, il peut s'agir de ligands de récepteurs de facteurs de croissance, de récepteurs de cytokines, de récepteurs de lectines cellulaires 5 ou de récepteurs de protéines d'adhésion. On peut également citer le récepteur de la transférine, des HDL et des LDL. L'élément de ciblage peut également être un sucre permettant de cibler les récepteurs asialoglycoprotéiques, ou encore un fragment Fab d'anticorps permettant de cibler le récepteur du fragment Fc des immunoglobulines.

10 Les compositions transfectantes décrites peuvent être utilisées pour le transfert d'acides nucléiques *in vitro*, *ex vivo* ou *in vivo*. Pour des applications *in vivo*, elles peuvent être formulées en vue d'administrations par voie topique, cutanée, orale, rectale, vaginale, parentérale, intranasale, intraveineuse, intramusculaire, sous-cutanée, intraoculaire, transdermique, 15 etc. De préférence, elles contiennent un véhicule pharmaceutiquement acceptable pour une formulation injectable, notamment pour une injection directe au niveau de l'organe désiré, ou pour une administration par voie topique (sur peau et/ou muqueuse). Il peut s'agir en particulier de solutions stériles, isotoniques, ou de compositions sèches, notamment lyophilisées, 20 qui, par addition selon le cas d'eau stérilisée ou de sérum physiologique, permettent la constitution de solutés injectables. Les doses d'acide nucléique utilisées pour l'injection ainsi que le nombre d'administrations peuvent être adaptées en fonction de différents paramètres, et notamment en fonction du mode d'administration utilisé, de la pathologie concernée, du gène à 25 exprimer, ou encore de la durée du traitement recherchée.

30 A cet égard, un autre objet de l'invention concerne un procédé pour le transfert d'acide nucléique dans des cellules *in vitro*, *in vivo* ou *ex vivo* comprenant la mise en contact dudit acide nucléique avec une suspension de lipide cationique préalablement chauffée, et l'incubation des cellules avec le complexe nucléolipidique résultant.

Avantageusement, la suspension de lipide cationique est préalablement chauffée et maturée. Toujours selon un mode préféré, le complexe nucléolipidique est mûr préalablement à l'incubation avec les cellules. L'incubation avec les cellules peut être faite *in vitro*, sur un support approprié (boîte de culture, pochette, flasque, etc) éventuellement en conditions stériles. Les quantités d'ADN incubées sont connues de l'homme du métier (de l'ordre du microgramme pour 10^6 cellules). Pour une utilisation *vivo*, l'incubation peut être effectuée par administration de la composition *in vivo* (locale ou systémique par exemple).

La présente invention sera plus complètement décrite à l'aide des exemples qui suivent, qui doivent être considérés comme illustratifs et non limitatifs.

Légende des figures :

Figure 1 : Structures chimiques de lipides cationiques. (1a) : DOGS, (1b) : RPR 120531, (1c) : RPR 120535.

Figure 2 : Influence de la température sur la densité optique à 400 nm d'une suspension de DOGS à 1 mM dans le NaCl.

Figure 3 : Cliché de Cryo-microscopie en transmission d'une suspension de DOGS à 2 mM dans le NaCl à pH 7,5. La préparation de l'échantillon a été réalisée immédiatement après chauffage (3a), 3 heures (3b), 1 semaine (3c) et 1 mois (3d) après chauffage de la suspension et refroidissement à température ambiante.

Figure 4 : Influence du pH sur la densité optique à 400 nm d'une suspension de DOGS à 0,6 mM dans l'eau ou dans le NaCl à 150 mM. Température de l'étude : 50°C. Les traits pointillés verticaux représentent les valeurs des pKa du DOGS.

Figure 5 : Diagrammes de Phases du DOGS (5a : eau; 5b : NaCl 150 mM), du RPR120531 (5c : eau; 5d : NaCl 150 mM) et du RPR120535 (5e : eau; 5f : NaCl 150 mM).

Figure 6 : Pouvoir transfectant des compositions de l'exemple 5

Figure 7 : Pouvoir transfectant des compositions de l'exemple 6
Figure 8 : Pouvoir transfectant des compositions de l'exemple 7
Figure 9 : Pouvoir transfectant des compositions de l'exemple 8
Figure 10 : Pouvoir transfectant des compositions de l'exemple 9
5 Figure 11 : Pouvoir transfectant des compositions de l'exemple 10
Figure 12 : Pouvoir transfectant des compositions de l'exemple 11

MATERIEL ET METHODES

1. Le plasmide utilisé dans les exemples suivants (pXL2784) est un dérivé ColE1 portant le gène de résistance à la Kanamycine, et le fragment cer de 10 ColE1. La cassette d'expression eucaryote contient le promoteur CMV du plasmide pCDNA3 contrôlant le gène codant pour la luciférase (Photinus Pyralis). Il est entendu que tout autre acide nucléique peut être utilisé.

2. Les lipides cationiques utilisés dans les exemples suivants sont le DOGS, le RPR120531 et le RPR120535 dont la structure est représentée figure 1. Il 15 est entendu que les mêmes expériences peuvent être réalisées avec d'autres lipides cationiques.

3. Protocole de transfection. Le procédé décrit vaut pour les transfections *in vitro, ex vivo et in vivo*.

Les cellules utilisées sont des fibroblastes murins NIH 3T3, ensemencés le 20 jour précédent en plaques 24 trous, à une densité de 50 000 cellules par trou. Le milieu de culture utilisé est le milieu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), contenant 4,5 g/l de glucose, complémenté avec 10% de sérum de veau foetal, de 1% de L-glutamine (solution mère à 200 mM), de 1% de pyruvate de sodium, de streptomycine (5000 UI/ml) et de pénicilline 25 (5000 µg/ml) (Gibco).

Préalablement à la transfection les cellules sont rincées 2 fois avec du DMEM ne contenant pas de sérum de veau foetal.

La transfection des cellules est réalisée par 50 µl d'une suspension de transfection contenant 0,5 µg d'ADN et 3 nmoles de DOGS par trou, dans

200 µl de milieu de culture additionné ou non de 10% de sérum de veau foetal.

Après une incubation de 4 heures à 37°C (dans un incubateur à CO₂), le milieu de culture contenant le complexe nucléolipidique est éliminé et
5 remplacé par 500 µl de DMEM complémenté à 10 % de sérum de veau foetal. Les cellules sont ensuite incubées pendant 48 heures.

4. Mesure de l'activité luciférase de cellules eucaryotes.

Elle est effectuée 48 heures après transfection. La luciférase catalyse l'oxydation de la luciférine, en présence d'ATP, de Mg²⁺ et d'O₂, avec
10 production concomitante d'un photon. L'émission totale de lumière, mesurée par un luminomètre, est proportionnelle à l'activité luciférase de l'échantillon. Les réactifs utilisés sont fournis par Promega (Luciferase assay system) et utilisés selon un protocole conseillé. Après un double rinçage des cellules par du PBS, les cellules sont lysées par 250 µl de tampon de lyse et la
15 fraction insoluble de chaque extrait est éliminée par centrifugation. Le dosage est effectué sur 5µl de surnageant, dilué ou non dans le tampon de lyse des cellules.

EXEMPLES

Exemple 1 : Influence de la température sur l'organisation moléculaire des
20 lipides cationiques.

Une solution colloïdale de DOGS à 1mM a été préparée par dissolution du DOGS cristallisé dans le chloroforme, évaporation du solvant et séchage au lyophilisateur. Le film a ensuite été repris par une solution de NaCl 0,9% tampon (Hépès 10mM, pH 7,4). Après chauffage à 50°C, la solution colloïdale a été placée à 4°C pendant une semaine. La densité optique est suivie en continu (Spectrophotomètre Lambda 2 (Perkin Elmer) avec porte-cuve thermostaté), tant que la température du bain (LAUDA RM6), lui-même relié aux cuves de spectrophotomètre, varie à une vitesse déterminée

et contrôlée de 1,25°C/mn. La cuve renfermant l'échantillon est munie d'un système d'agitation.

Les résultats obtenus sont présentés sur la Figure 2. Ils font apparaître une chute brutale de la densité optique autour de 40°C environ. Cette chute de
5 DO traduit un réarrangement profond de la structure du lipide.

Parallèlement, l'état physique du DOGS au cours de ces variations de température a été étudié par cryomicroscopie en transmission. Pour cela, une suspension de DOGS à 2mM dans le NaCl à pH 7,5 a été chauffée à 50°. La nature physique des objets a été déterminée après chauffage au cours du
10 temps, pendant la maturation par incubation à température ambiante. Les résultats obtenus sont présentés sur la Figure 3 : La préparation de l'échantillon a été réalisée immédiatement après chauffage (3a), 3 heures (3b), 1 semaine (3c) et 1 mois (3d) après chauffage de la suspension et refroidissement à température ambiante.
15 Les résultats obtenus montrent une évolution de la structure du DOGS, depuis le stade micellaire jusqu'à la formation de corps lamellaires, en passant par des structures en batonnets et vermicules. Cet exemple permet de définir des conditions de maturation pré-compaction du lipide.

Exemple 2 : Influence du pH sur l'organisation moléculaire des lipides cationiques
20

Une solution colloïdale de DOGS à 1mM a été préparée par dissolution du DOGS cristallisé dans le chloroforme, évaporation du solvant et séchage au lyophilisateur. Le film a ensuite été repris par une solution de NaCl 150 mM ou par de l'eau, dans une gamme de pH allant de 3.0 à 11.0. Après
25 chauffage à 50°C, les suspensions sont placées à température ambiante (25°C) 3 heures au moins avant le début de la mesure. La densité optique est déterminée dans les conditions décrites dans l'exemple 1.

Les résultats obtenus sont présentés sur la figure 4. Ils font apparaître très nettement une augmentation de la densité optique en fonction du pH. Cette

augmentation traduit une augmentation des interactions entre les molécules de lipides, par diminution des répulsions électrostatiques.

Exemple 3 : Diagrammes de Phases des lipides cationiques

Pour valider les observations faites dans les exemples 1 et 2, des diagrammes de phases ont été tracés pour différents vecteurs lipidiques. Ces diagrammes décrivent l'état physique des lipides selon les conditions de pH, de force ionique et de température. Ils mettent également en évidence les température de transition de phase et le comportement agrégatif du lipide en fonction de son état d'ionisation.

Ces diagrammes sont présentés sur les Figures 5a et 5b pour le DOGS, 5c et 5d pour le RPR120531 et 5e et 5f pour le RPR120535. Ils montrent que, dans le cas où le lipide est solubilisé dans de l'eau pure ($\text{pH} \leq 6$) la solution micellaire de obtenue par chauffage selon l'invention est stable. Ils permettent également de définir les conditions de force ionique et de pH pour lesquelles la solution micellaire est stable dans le temps.

Exemple 4 : Etude de différents contre-ions dans l'électrolyte de fond.

Différents contre-ions ont été testés dans l'étape de maturation. Pour cela, différentes suspensions de DOGS dans un milieu dont l'électrolyte de fond est présent à une concentration de 0.1 M et dont le pH n'est pas ajusté (pH natif : 3,5) ont été observées une semaine après chauffage et refroidissement à température ambiante:

- Dans KNO₃, les structures nanométriques sont de type micellaire et on observe quelques rares bords marqués. Les structures submicroniques sont des filaments fins à forte tendance agrégative.
- Dans KI, les structures nanométriques se présentent sous l'aspect de superposition de lamelles dont les bords apparaissent très marqués. Les structures submicroniques se présentent également sous la forme de filaments mais dont l'épaisseur est supérieure et à moins forte tendance agrégative.

Exemple 5A. Protocole de préparation du complexe et transfection :

Le lipide (DOGS) est présenté à l'ADN sous la forme d'une suspension à 2 mM dans le NaCl 150 mM à pH natif (3,5) chauffé et laissé à température ambiante 1 jour avant contact avec l'ADN ("pré-maturation de 1 jour"). Le lipide est introduit dans une suspension contenant le plasmide pXL2784 et composée de 150 mM NaCl ajusté à un pH de 5 - 6,6 ou 8,2 (ces pH sont des valeurs mesurées). La "maturation de post-compaction" est de 0 ou 3 heures à température ambiante et la transfection a été réalisée en présence 5 (SVF) et en l'absence de sérum de veau foetal.

10

B. Résultats :

Les résultats de transfection exprimés en RLU (Relative Light Unit) pour 5 µl de lysat, soit 1/50ème de puits, sont présentés sur la Figure 6. Chaque valeur est une moyenne de mesure sur 4 puits. Les écarts types sont 15 représentés par des barres horizontales.

Cette étude montre qu'en partant d'une solution micellaire, une compaction dans un milieu salin de fort pH (ici 8,2) permet de s'affranchir de l'effet inhibiteur du sérum, quel que soit la "maturation de post-compaction". Par ailleurs, lorsqu'un pH intermédiaire de compaction (toujours en milieu salin) 20 est utilisé, "une maturation de post-compaction" permet également de s'affranchir de l'effet inhibiteur sur la transfection du sérum.

Une étude similaire a été réalisée sur les lipides RPR 120531 et RPR 120535 (voir figure 1 pour les structures du DOGS, RPR 120531 et RPR 120535). Elle montre un comportement similaire à celui de DOGS 25 relativement à l'influence du pH de compaction et de la "maturation post-compaction" sur l'affranchissement de l'effet sérum.

Exemple 6A. Protocole de préparation du complexe et transfection :

Le lipide (DOGS) est présenté à l'ADN soit sous la forme d'une suspension à 2 mM dans le NaCl 150 mM à pH natif (3,5) chauffé et laissé à température ambiante 1 jour avant contact avec l'ADN ("pré-maturation de 1 jour") soit sous la forme d'une solution à 2mM dans l'éthanol (EtOH). Le lipide est
5 introduit dans une suspension contenant le plasmide pXL2784 et composée de 150 mM NaCl ajusté à un pH de 4.2 - 6,2 - 7.2 ou 8,2 (ces pH sont des valeurs mesurées) ou encore dans du milieu de culture DMEM. Aucune "maturation de post-compaction" n'est réalisée sauf dans le cas où la compaction est effectuée à un pH de 6,2 (pH 6,2 + mat.). Dans ce cas la
10 "maturation post compaction" est de 3 heures à température ambiante. La transfection a été réalisée en présence (SVF) et en l'absence de sérum de veau foetal (SS SVF).

B. Résultats :

Les résultats de transfexion exprimés en RLU (Relative Light Unit) pour 5 µl
15 de lysât, soit 1/50ème de puits, sont présentés sur la Figure 7. Chaque valeur est une moyenne de mesure sur 4 puits. Les écarts types sont représentés par des barres horizontales.

Cette étude montre que le comportement des particules d'ADN compacté vis à vis de l'inhibition du sérum de veau foetal vu dans l'exemple 5 (en fonction
20 du pH de compaction et de la "maturation post-compaction") est également valable que le DOGS se présente sous la forme d'une suspension en milieu salin ou sous la forme d'une solution éthanolique. Elle montre également que l'étape de "maturation post-compaction" permet de s'affranchir de l'inhibition par le sérum.

25 Exemple 7

A. Protocole de préparation du complexe et transfexion :

Le lipide (DOGS) est présenté à l'ADN sous la forme d'une suspension à 2 mM dans le NaCl 150 mM à pH natif (3,5) chauffé immédiatement (NM : pour Non pré-Maturé) avant contact avec l'ADN ou "pré-maturé" 1jour avant

compaction (1J). Le lipide est introduit dans une suspension contenant le plasmide PXL2784 et composée de 150 mM NaCl ajusté à un pH de 6,2. (ce pH est une valeur mesurée). La "maturation de post-compaction" est de 0 - 0,5 heure - 3 heures - 1 jour lorsque le lipide n'a pas été "pré-maturé", elle 5 est de 3 heures lorsque le lipide a été "pré-maturé 1 jour" à température ambiante (témoin). La transfection a été réalisée en présence et en l'absence de sérum de veau foetal. Les résultats obtenus en l'absence de sérum de veau foetal n'étant pas significativement différents selon les différents protocoles étudiés, seuls sont représentés les résultats des transfctions 10 réalisées en présence de sérum de veau foetal.

B. Résultats :

Les résultats de transfection exprimés en RLU (Relative Light Unit) pour 5 µl de lysat, soit 1/50ème de puits, sont présentés sur la Figure 8. Chaque valeur est une moyenne de mesure sur 4 puits. Les écarts types sont 15 représentés par des barres horizontales.

Cette étude montre qu'une absence de "pré-maturation" du DOGS (chauffage immédiatement avant mise en contact avec l'ADN) oblige à augmenter le temps de "maturation post-compaction" nécessaire à l'affranchissement de l'effet inhibiteur du sérum. La structure adoptée par le 20 lipide avant sa mise en contact avec l'ADN semble donc permettre d'accélérer l'organisation du complexe lipide-ADN.

Il semble également qu'une compaction réalisée avec un lipide non prématuré mais suivi d'un temps de "maturation post-compaction" suffisant (IM - 1J), permette la formation de particules plus efficaces sur la transfection 25 que si le lipide a été prématuré (1J - 3H), peut-être parce que les particules formées sont plus petites et de taille plus régulière.

Exemple 8

A. Protocole de préparation du complexe et transfection :

Le lipide (DOGS) est présenté à l'ADN sous la forme d'une suspension à 2 mM soit dans l'eau à pH 7,5 et "pré-maturé" 1 jour avant compaction (eau 7,5), soit sous la forme d'une suspension dans le NaCl 150 mM à pH 7,5 également "pré-maturé" 1 jour (NaCl 7,5). Le lipide est introduit dans une 5 suspension contenant le plasmide pXL2784 et composée de 150 mM NaCl ajusté à un pH de 7,2. (ce pH est une valeur mesurée). La "maturation de post-compaction" est de 0 (0) ou 3 heures (3H). La transfection a été réalisée en présence de sérum de veau foetal.

B. Résultats :

10 Les résultats de transfection exprimés en RLU (Relative Light Unit) pour 5 µl de lysat, soit 1/50ème de puits, sont présentés sur la Figure 9. Chaque valeur est une moyenne de mesure sur 4 puits. Les écarts types sont représentés par des barres horizontales.

Ces résultats montrent qu'il est possible de s'affranchir de l'effet inhibiteur du 15 sérum ainsi que de la "maturation post-compaction" en permettant au lipide avant compaction d'être plus structuré : les conditions de pH et de force ionique supérieurs dans le cas NaCl; 7,5 sont en effet favorables à un certain type d'organisation. Cette étude montre également que, lorsque la "maturation post-compaction" a lieu, il semble préférable pour une bonne 20 efficacité de transfection de compacter l'ADN avec un lipide dont la taille particulaire n'est pas trop importante (eau 7,5). Pour une bonne efficacité de transfection en présence de sérum il semble donc qu'il faille réaliser un compromis entre structuration du lipide et taille des particules.

Exemple 9

25 **A. Protocole de préparation du complexe et transfection :**

Le lipide (DOGS) est présenté à l'ADN sous la forme d'une suspension à 2 mM dans le NaCl 150 mM à pH natif (3,5) et "pré-maturé" 1jour avant compaction (1J) ou 4 jours avant compaction (4J). Le lipide est introduit dans une suspension contenant le plasmide pXL2784 et composée de 150 mM

NaCl ajusté à un pH de 6,6. (ce pH est une valeur mesurée). La "maturation de post-compaction" est de 0 (0) ou 3 heures (3H). La transfection a été réalisée en présence (SVF) et en l'absence de sérum de veau foetal.

B. Résultats :

5 Les résultats de transfection exprimés en RLU (Relative Light Unit) pour 5 µl de lysat, soit 1/50ème de puits, sont présentés sur la Figure 10. Chaque valeur est une moyenne de mesure sur 4 puits. Les écarts types sont représentés par des barres horizontales.

Cette étude ne montre pas de différence significative entre les différents
10 protocoles lorsque la transfection est réalisée en l'absence de sérum de veau foetal. En revanche en présence de sérum, on constate qu'une "pré-maturation" longue (4 jours) peut permettre de s'affranchir en partie de l'effet inhibiteur du sérum lorsqu'il n'a pas été procédé à une "maturation post-compaction". Cette étude montre également que lorsqu'on procède à une
15 "maturation post-compaction", une "pré-maturation" supplémentaire s'avère inutile mais non néfaste, tout du moins dans le cas d'une pré-maturation dans NaCl 150 mM à pH natif, et pour les temps de "pré-maturation" décrits ci-dessus.

Exemple 10

20 A. Protocole de préparation du complexe et transfection :

Le lipide (DOGS) est présenté à l'ADN sous la forme d'une suspension à 2 mM dans le NaCl 150 mM à pH 7,5 et soit chauffé immédiatement (IM), soit "pré-maturé" 1jour (1J), soit "pré-maturé" 1 mois (1M) avant la compaction.
25 Le lipide est introduit dans une suspension contenant le plasmide pXL2784 et composée de 150 mM NaCl ajusté à un pH de 7,2. (ce pH est une valeur mesurée). La "maturation de post-compaction" est de 0 (0) ou 3 heures (3H). La transfection a été réalisée en présence de sérum de veau foetal.

B. Résultats :

Les résultats de transfection exprimés en RLU (Relative Light Unit) pour 5 µl de lysât, soit 1/50ème de puits, sont présentés sur la Figure 11. Chaque valeur est une moyenne de mesure sur 4 puits. Les écarts types sont représentés par des barres horizontales.

- 5 Cette étude montre qu'une "pré-maturation" permet de s'affranchir en partie de l'effet inhibiteur du sérum sur la transfection lorsqu'on ne procède pas à une "maturation post-compaction". En revanche lorsqu'une maturation du complexe nucléolipidique est entreprise il est constaté que l'efficacité de transfection obtenue est meilleure lorsque le lipide a été chauffé
- 10 10 immédiatement avant sa mise en contact avec l'ADN et donc qu'il se trouve sous la forme de petites particules lipidiques.

Exemple 11

A. Protocole de préparation du complexe et transfection :

Le lipide (DOGS) est présenté à l'ADN sous la forme d'une solution micellaire à 2 mM dans l'eau pure (pH natif de 3,5). Le lipide est introduit dans une suspension contenant le plasmide pXL2784 et composée de 150 mM NaCl ajusté à un pH de 7,3. (ce pH est une valeur mesurée). La "maturation de post-compaction" est de 0 (0) - 0.5 heure (0,5H) - 3 heures (3H) - 1 jour (1J) ou 1 semaine (1S). La transfection a été réalisée en présence de sérum de veau foetal.

B. Résultats :

Les résultats de transfection exprimés en RLU (Relative Light Unit) pour 5 µl de lysât, soit 1/50ème de puits, sont présentés sur la Figure 12. Chaque valeur est une moyenne de mesure sur 4 puits. Les écarts types sont représentés par des barres horizontales.

Cette étude confirme que lorsque DOGS est présenté à l'ADN sous la forme d'une solution micellaire, une "maturation post-compaction" devient nécessaire pour s'affranchir de l'effet inhibiteur du sérum. On constate dans

le cas présent qu'une maturation "post-compaction" de 3 heures s'avère suffisante.

L'ensemble de ces résultats montre que le procédé de l'invention, impliquant une étape préalable de chauffage et des étapes avantageuses de 5 maturation, permet d'obtenir des compositions définies, homogènes, reproductibles, dont les propriétés transfectantes sont améliorées.

BIBLIOGRAPHIE

Barthel F., Remy J.S., Loeffler J.P. and Behr J.P., Gene Transfer Optimization with Lipospermine-Coated DNA. *DNA Cell Biol.* **12** : 533-560 (1993).

5 Behr J.P., Demeneix B., Loeffler J.P. and Perez-Mutul J., Efficient Gene Transfer into Mammalian Primary Endocrine Cells with Lipopolyamine-Coated DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86** : 6982-6986 (1989).

Bringham K.L., Meyrick B., Christman B., Berry, Jr L.C. and King G. Expression of a Prokaryotic Gene in Cultured Lung Endothelial Cells after

10 Lipofection with a Plasmid Vector. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **1** : 95-100 (1989).

Demeneix B.A., Fredriksson G., Lezoual'ch F., Daugeras-Bernard N., Behr J.P. and Loeffler J.P., Gene Transfer into Intact Vertebrate Embryos. *Int. J. Dev. Biol.* **35** : 481-484 (1991).

15 Düzgünes N., Goldstein J.A., Friend D.S. and Felgner P.L., Fusion of Liposomes Containing a Novel Cationic Lipid, N-[2,3-(Dioleyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammonium : Induction by Multivalent Anions and Asymmetric Fusion with Acidic Phospholipid Vesicles. *Biochemistry* **28** : 9179-9184 (1989).

20 Fasbender A.J., Zabner J. and Welsh M.J., Optimization of Cationic Lipid-Mediated Gene Transfer to Airway Epithelia. *Am. J. Physiol.* **269** : 45-51 (1995).

Felgner P.L., Gadek T.R., Holm M., Roman R., Chan H.W., Wenz M., Northrop J.P., Ringold G. and Danielsen M., Lipofection : A Highly Efficient,

25 Lipid-Mediated DNA-Transfection Procedure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84** : 7413-4717 (1987).

Gao X. and Huang L., A Novel Cationic Liposome Reagent for Efficient Transfection of Mammalian Cells. *Biochem. Biophys. Res. Com.* **179** : 280-285 (1991).

30 Guershon H., Ghirlando R., Guttman S.B. and Minsky A., Mode of Formation and Structural Features of DNA-Cationic Liposome Complexes Used for Transfection. *Biochemistry* **32** : 7143-7151 (1993).

Gustafsson J., Arvidson G., Karlsson G. and Almgren M. Complexes between Cationic Liposomes and DNA Visualized by Cryo-TEM. *Biochim. Biophys. Acta* **1235** : 305-312 (1995).

Hui S.W., Langner M., Zhao Y.L. Ross P., Hurley E. and Chan K., The role of 5 Helper Lipid Cationic Liposome-Mediated Gene Transfer. *Biophys. J.* **71** : 590-599 (1996).

Hofland H.E.J., Shephard L. and Sullivan S.M., Formation of Stable Cationic Lipid/DNA Complexes for Gene Transfer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93** : 7305-7309 (1996).

10 Pinnaduwage P., Schmitt L. and Huang L., Use of a Quaternary Ammonium Detergent in Liposome Mediated DNA Transfection of Mouse L-Cells. *Biochim. Biophys. Acta* **985** : 33-37 (1989).

Sternberg B., Sorgi F.L. and Huang L., New Structures in Complex Formation between DNA and Cationic Liposomes Visualized by Freeze-Fracture 15 Electron Microscopy. *FEBS Lett.* **356** : 361-366 (1994).

Xu Y. and Szoka, Jr F.C., Mechanism of DNA Release from Cationic Liposome/DNA Complexes Used in Cell Transfection. *Biochemistry* **35** : 5616-5623 (1996).

REVENDICATIONS

1. Procédé de préparation d'une composition pour le transfert d'acides nucléiques comprenant la mise en contact d'un acide nucléique avec un lipide cationique, caractérisé en ce que, préalablement à la mise en contact, le lipide cationique est soumis à une étape de chauffage.
2. Procédé selon la revendication 1 caractérisé en ce que le lipide cationique est chauffé jusqu'à formation d'une solution micellaire.
3. Procédé selon la revendication 2 caractérisé en ce que le lipide cationique est chauffé jusqu'à une température supérieure à sa température de transition de phase.
4. Procédé selon la revendication 1 caractérisé en ce qu'il comprend en outre, entre l'étape de chauffage et l'étape de mise en contact, une étape de maturation pré-compaction du lipide cationique.
5. Procédé selon la revendication 1 ou 4 caractérisé en ce qu'il comprend en outre, après l'étape de mise en contact, une étape de maturation post-compaction du complexe nucléolipidique.
6. Procédé selon la revendication 1 ou 4 caractérisé en ce que la mise en contact est réalisée à pH compris entre 4 et 10, de préférence entre 6 et 9.
7. Procédé selon la revendication 1 ou 4 caractérisé en ce que la mise en contact est réalisée à force ionique comprise entre 0 et 2M, de préférence 0,01 et 0,5M, de préférence entre 0,05 et 0,2M.
8. Procédé selon la revendication 4 caractérisé en ce que la maturation pré-compaction est réalisée par refroidissement, modification de la force ionique du milieu et/ou modification du pH du milieu.

9. Procédé selon la revendication 8 caractérisé en ce que la maturation pré-compaction est réalisée par incubation à température ambiante.
- 5 10. Procédé selon la revendication 9 caractérisé en ce que la maturation pré-compaction est réalisée par incubation à température ambiante pendant une période comprise entre 0,5 heure et 1 mois.
- 10 11. Procédé selon la revendication 8 caractérisé en ce que la maturation pré-compaction est réalisée jusqu'à formation d'agrégats organisés de type vermiculaires, tubulaires, lamellaires, hexagonaux et/ou colonnaires.
- 15 12. Procédé selon la revendication 11 caractérisé en ce que la maturation pré-compaction est réalisée jusqu'à l'apparition d'agrégats organisés de type vermiculaires et/ou tubulaires.
13. Procédé selon la revendication 5 caractérisé en ce que la maturation post-compaction est réalisée par refroidissement.
- 20 14. Procédé selon la revendication 13 caractérisé en ce que le refroidissement est réalisé par incubation à température ambiante.
- 15 15. Procédé selon la revendication 13 caractérisé en ce que la maturation post-compaction est réalisée jusqu'à formation d'agrégats organisés de type hexagonaux, lamellaires et/ou colonnaires, ou plus gros.
- 25 16. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes caractérisé en ce que le lipide cationique est choisi parmi les lipopolymères.
- 30 17. Procédé selon la revendication 16 caractérisé en ce que le lipide cationique est une lipospermine ou une lipothermine.

18. Procédé selon la revendication 1 caractérisé en ce que l'acide nucléique est un ADN.
- 19 Procédé selon la revendication 18 caractérisé en ce que l'ADN est un
5 plasmide, vecteur, ou fragment linéaire.
20. Procédé selon la revendication 1 caractérisé en ce que l'acide nucléique est un ARN.
- 10 21. Procédé pour le transfert d'acide nucléique dans des cellules *in vitro* ou *ex vivo* comprenant la mise en contact dudit acide nucléique avec une suspension de lipide cationique préalablement chauffée, et l'incubation des cellules avec le complexe nucléolipidique résultant.
- 15 22. Procédé selon la revendication 21 caractérisé en ce qu'il comprend la mise en contact de l'acide nucléique avec une suspension de lipide cationique préalablement chauffée et maturée.
- 20 23. Procédé selon la revendication 21 ou 22 caractérisé en ce que le complexe nucléolipidique est mûr préalablement à l'incubation avec les cellules.
- 25 24. Composition pour le transfert d'acides nucléiques caractérisé en ce qu'elle est essentiellement insensible à l'effet inhibiteur par le sérum et en ce qu'elle peut être obtenue par le procédé selon la revendication 1.
25. Composition selon la revendication 24 caractérisée en ce qu'elle comprend en outre un ou plusieurs adjuvants lipidiques.
- 30 26. Procédé selon la revendication 1 caractérisé en ce que le lipide cationique comprend en outre des adjuvants lipidiques.

2754272

1 / 15

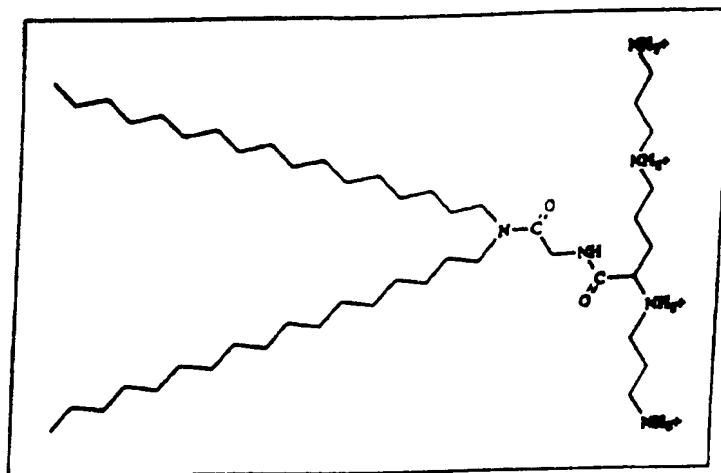


Figure 1 a

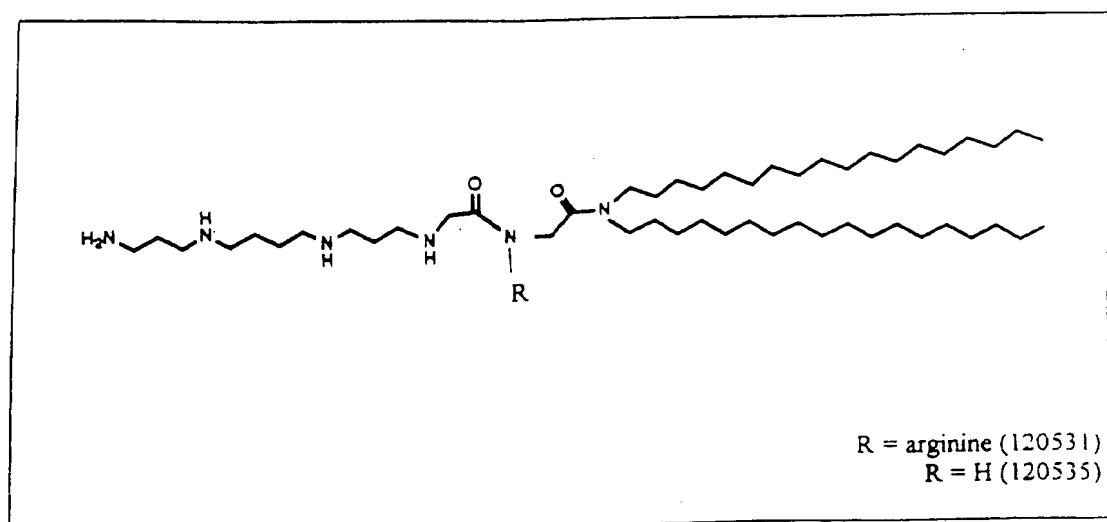


Figure 1 b

2754272

2/15

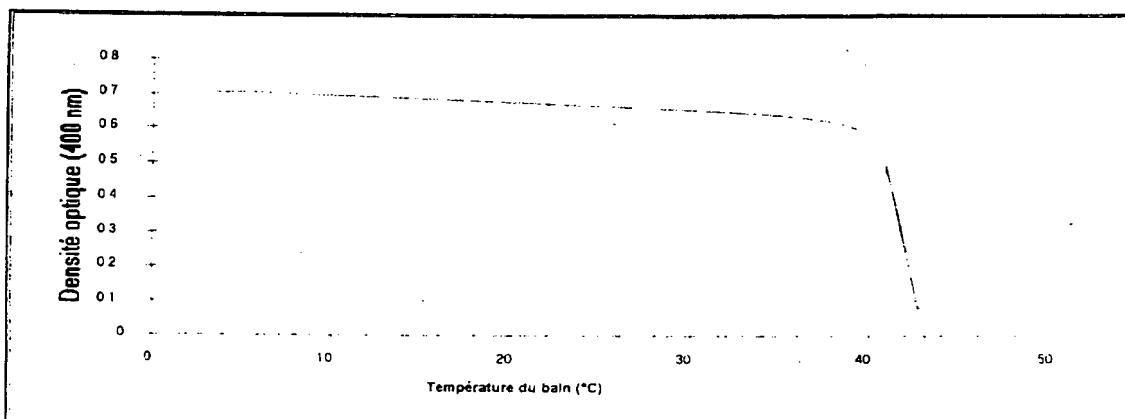


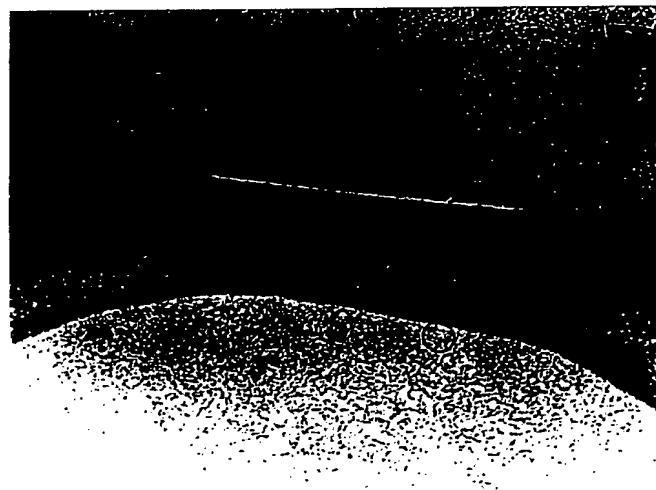
Figure 2

2754272

3/15



Figure 3A



2754272

4/15

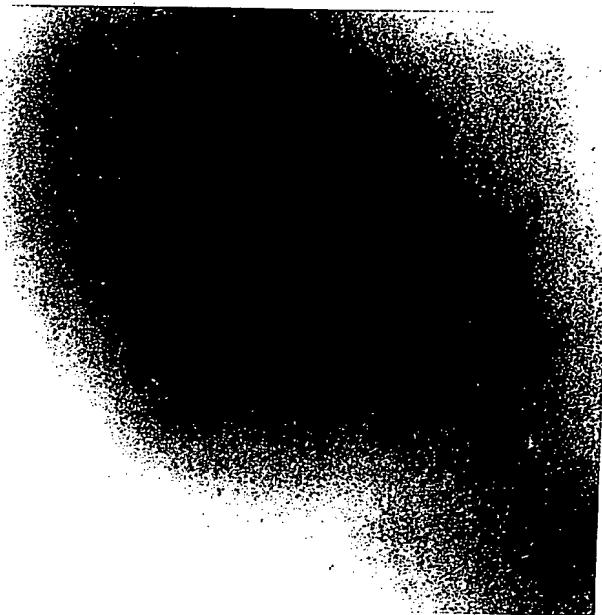


Figure 3C

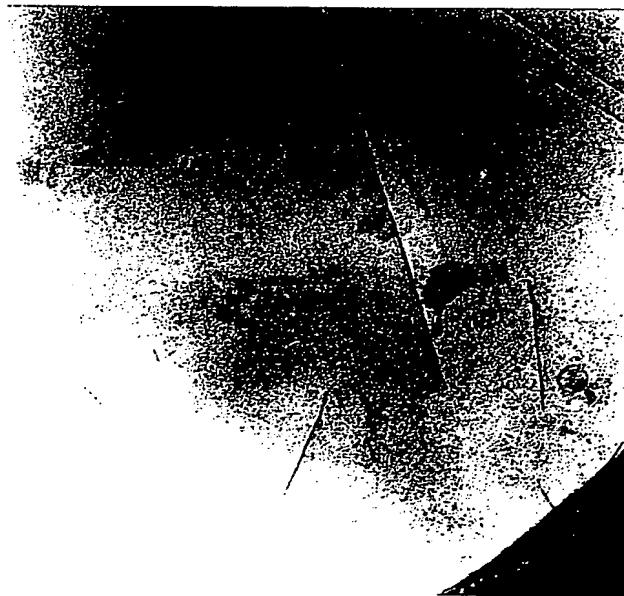


Figure 3D

5/15

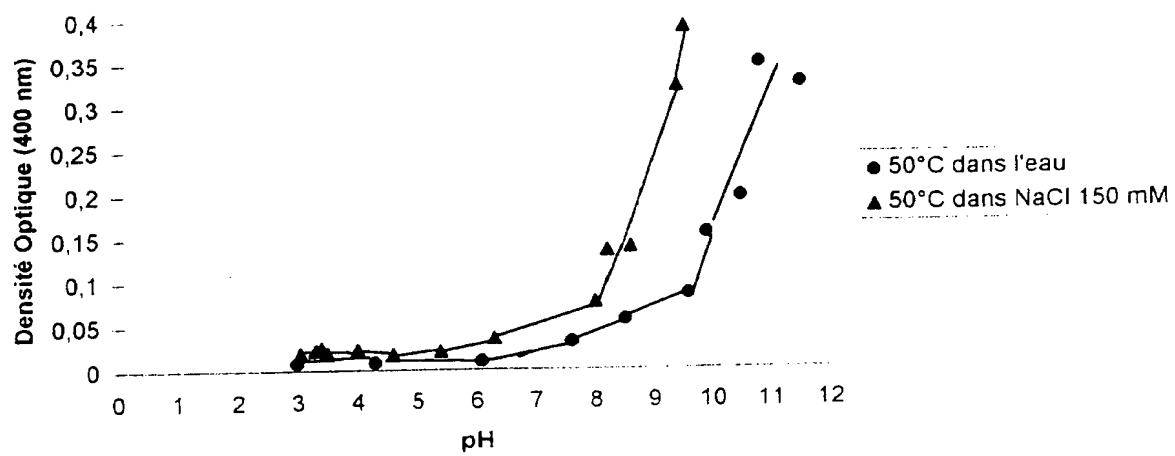


Figure 4

6/15

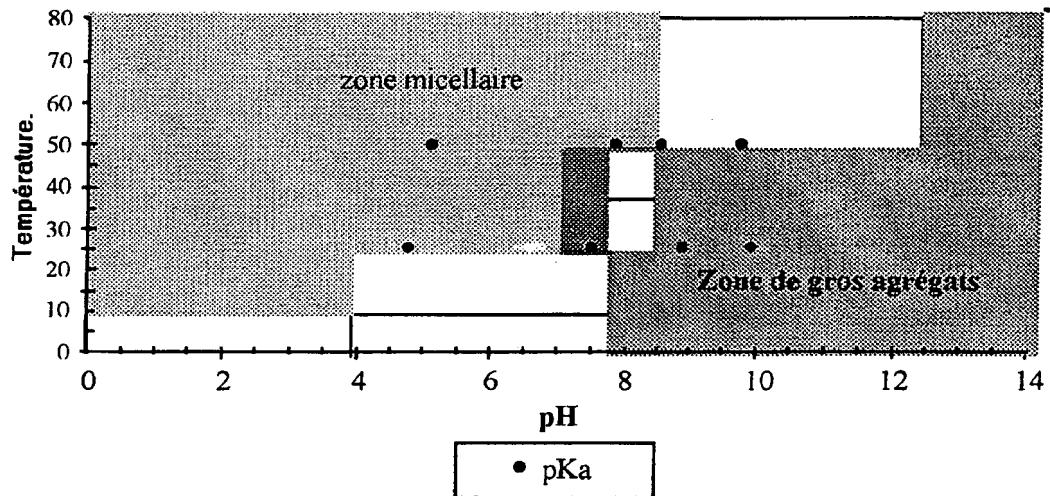


Figure 5(a)

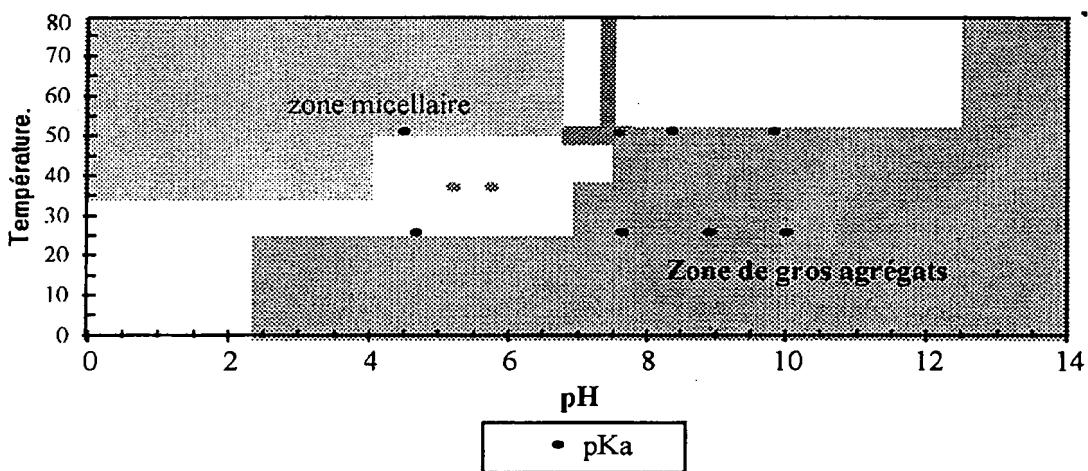


Figure 5(b)

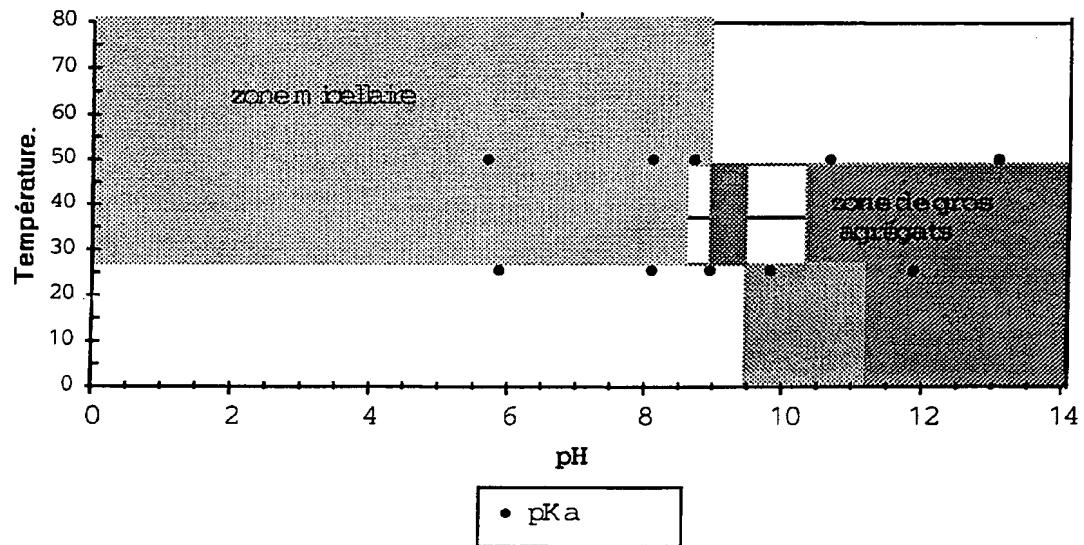


Figure 5(c)

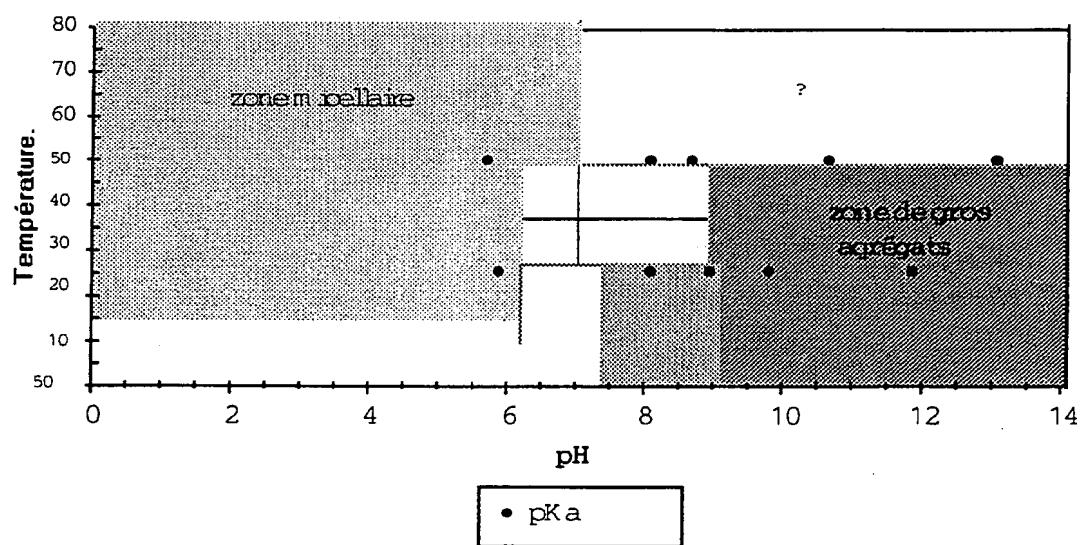


Figure 5(d)

8/15

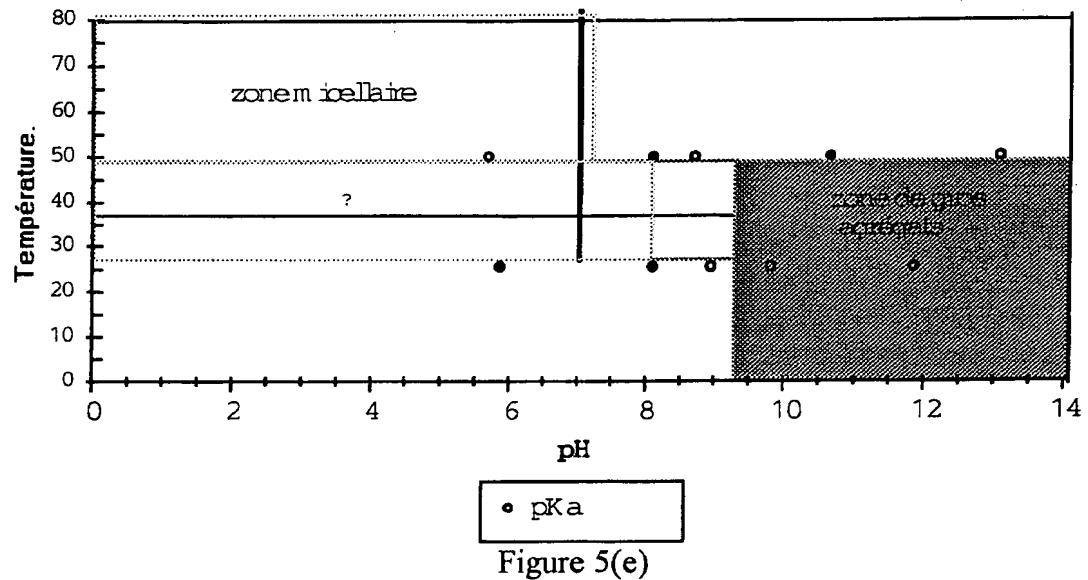


Figure 5(e)

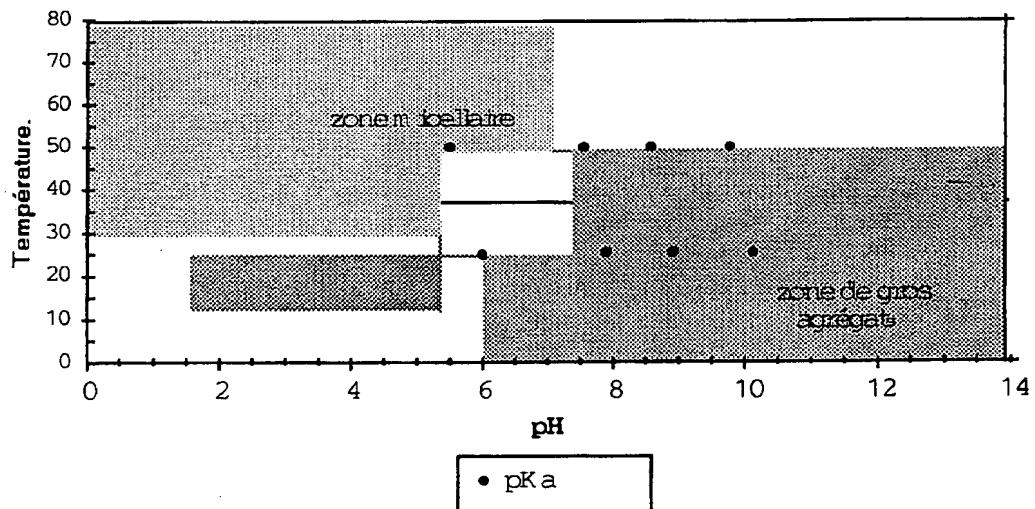


Figure 5(f)

9/15

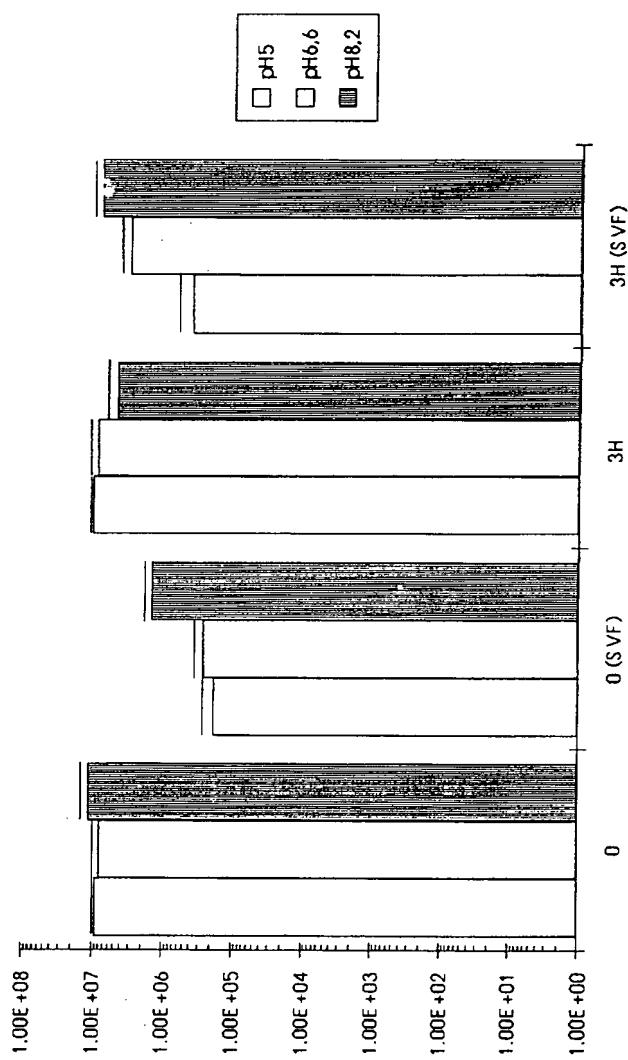


Figure 6

2754272

10/15

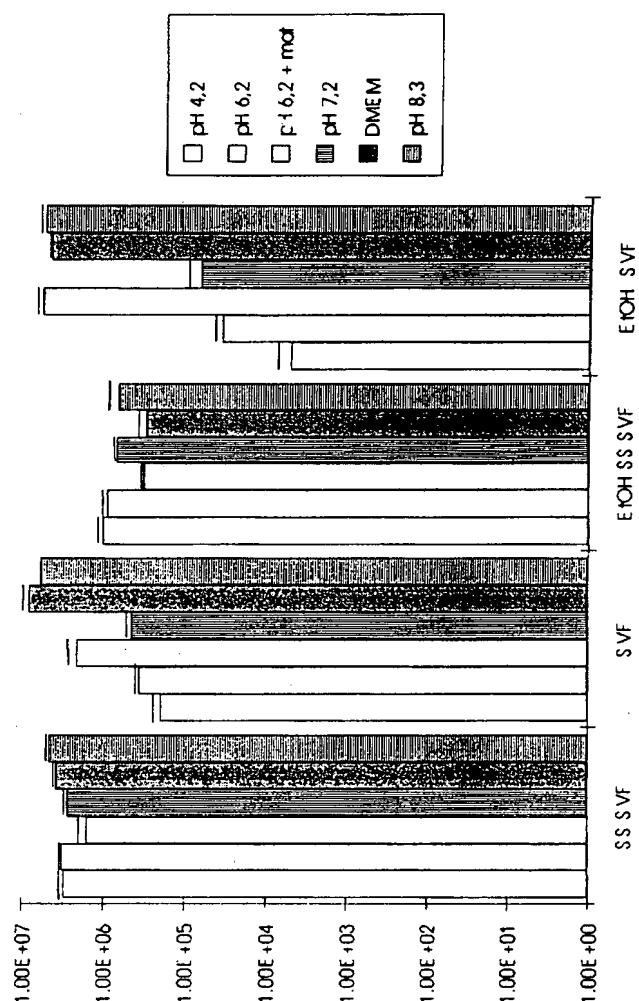


Figure 7

2754272

11/15

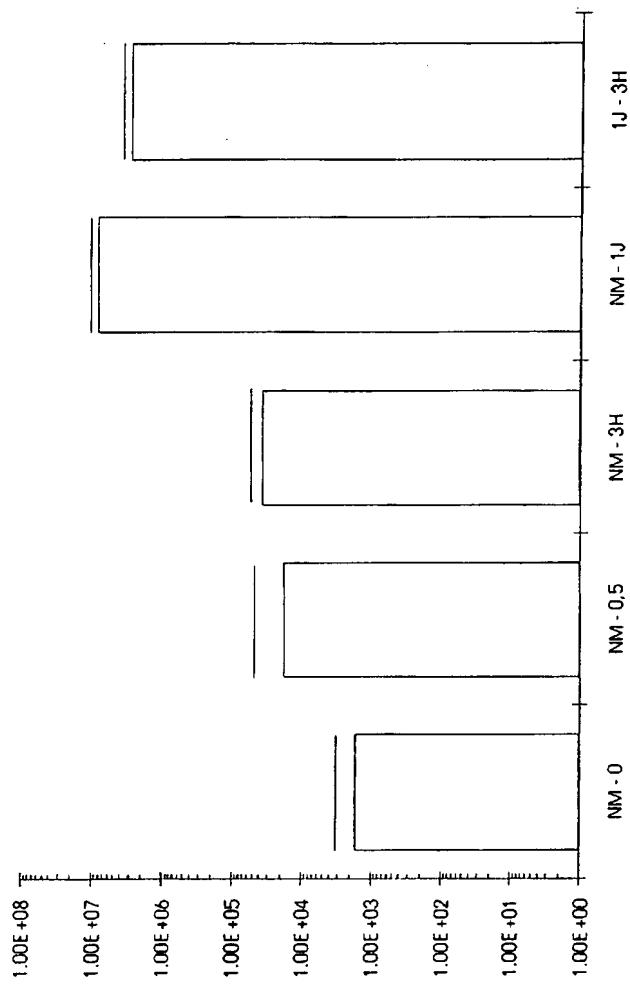


Figure 8

2754272

12/15

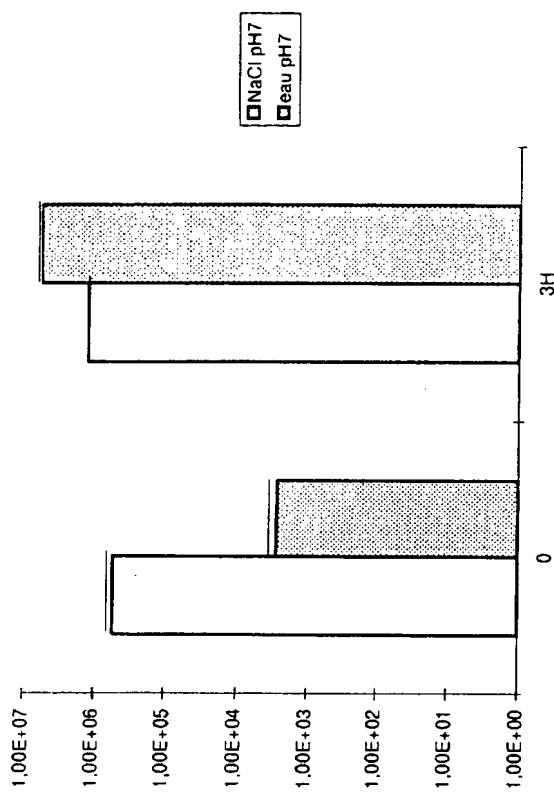


Figure 9

2754272

13/15

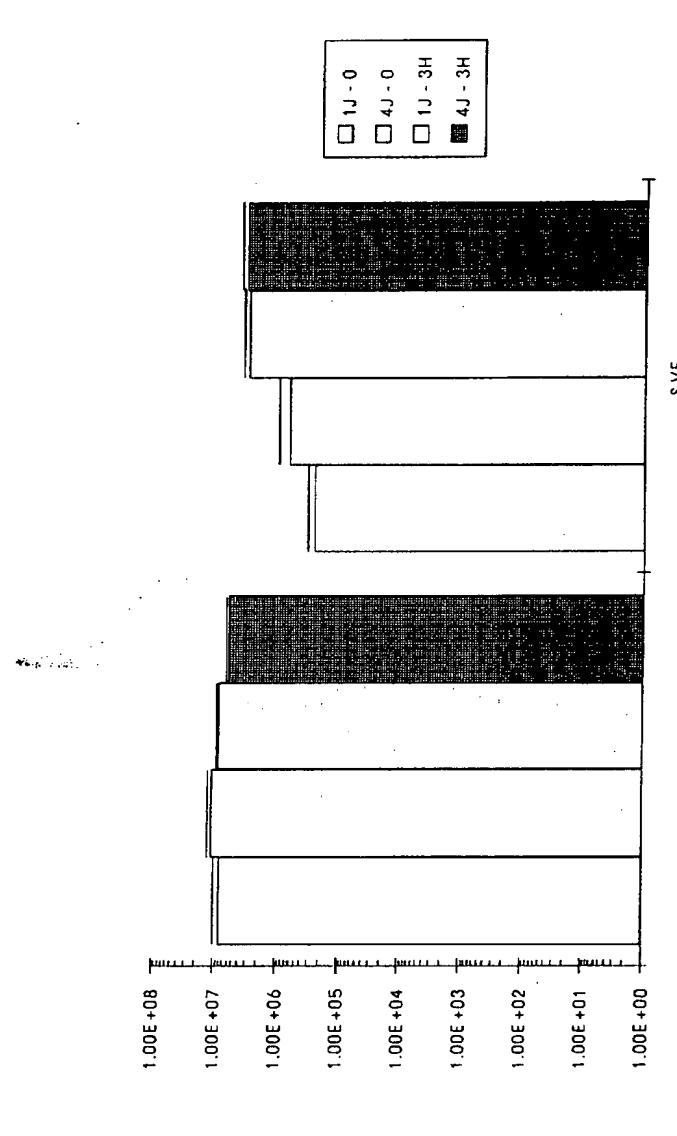


Figure 10

2754272

14/15

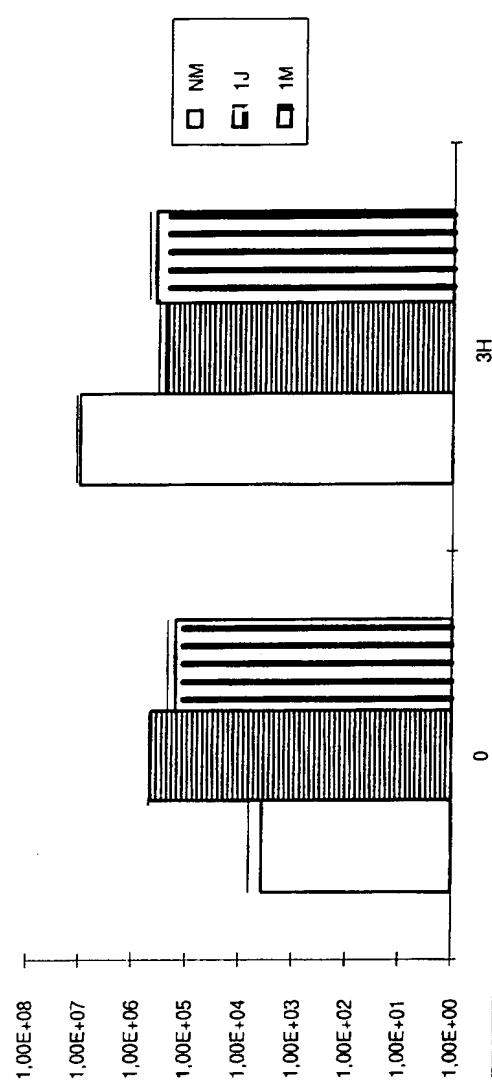


Figure 11

2754272

15/15

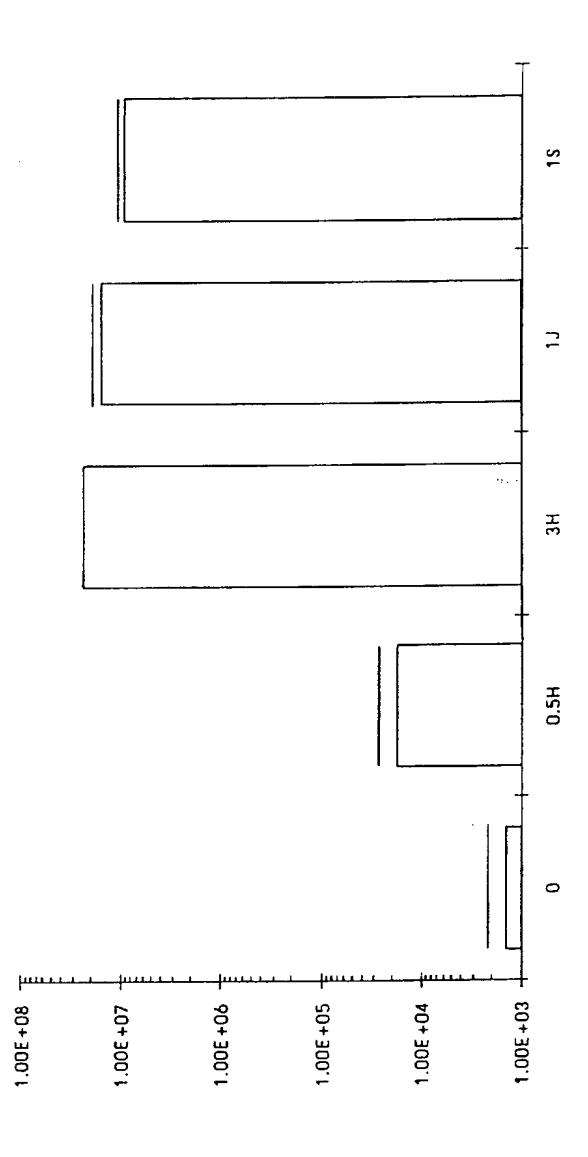


Figure 12

REPUBLIQUE FRANÇAISE

INSTITUT NATIONAL
de la
PROPRIETE INDUSTRIELLE

RAPPORT DE RECHERCHE
PRELIMINAIRE

établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

2754272

N° d'enregistrement
national

FA 533938
FR 9612259

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int.Cl.6)		
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes				
Y	WO 89 05636 A (THE LIPOSOME CORPORATION INC.) 29 Juin 1989 * abrégé * * page 10, ligne 32 - page 11, ligne 21 * * revendications 1-9 * ---	1-11, 16-20, 25,26			
Y	DATABASE WPI Section Ch, Week 8851 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class B05, AN 88-366133 XP002033669 & JP 63 277 618 A (NOEVIR KK) , 15 Novembre 1988 * abrégé * ---	1-11,25, 26			
Y	WO 95 18863 A (RHONE POULENC RORER S.A.) 13 Juillet 1995 * abrégé * * page 6, ligne 19 - ligne 31 * * revendications * ---	1-11, 16-20, 25,26			
A	JOURNAL OF LIPOSOME RESEARCH, vol. 4, no. 1, 1 Mars 1994, NEW YORK, US, pages 361-395, XP000450216 CHUN-JUNG CHU ET AL: "PH-SENSITIVE LIPOSOMES" * page 364 - page 366 * ---	1-4,6, 16-22	C12N A61K		
3		-/-			
Date d'achèvement de la recherche		Examinateur			
26 Juin 1997		Panzica, G			
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES					
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgarion non écrite P : document intercalaire					
T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant					

REPUBLIQUE FRANÇAISE

INSTITUT NATIONAL
de la
PROPRIETE INDUSTRIELLE

RAPPORT DE RECHERCHE
PRELIMINAIRE

établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

2754272

N° d'enregistrement
national

FA 533938
FR 9612259

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
A	JOURNAL OF LIPOSOME RESEARCH, vol. 2, no. 1, 1 Janvier 1992, NEW YORK US, pages 125-139, XP000246010 XIAOHUAI ZHOU ET AL: "IMPROVED ENCAPSULATION OF DNA IN PH-SENSITIVE LIPOSOMES FOR TRANSFECTION" * abrégé * * page 126 * * page 131 - page 135; figure 3 * ---	1,4-6,8, 16-19
A,D	WO 96 17823 A (RHONE POULENC RORER S.A.) 13 Juin 1996 ---	
A,D	DNA AND CELL BIOLOGY, vol. 12, no. 6, 1 Juillet 1993, pages 553-560, XP000600772 BARTHEL F ET AL: "GENE TRANSFER OPTIMIZATION WITH LIPOSERMIN-COATED DNA" ---	
A	US 4 873 089 A (SCOTTO ANTHONY W. ET AL.) 10 Octobre 1989 * le document en entier * -----	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int.CL.6)
3		
Date d'achèvement de la recherche		Examinateur
26 Juin 1997		Panzica, G
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES		
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire		
T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant		